

PHENYLDIAZIRINE COMPOUND AND PHOTOAFFINITY REAGENT

Publication number: JP2000319262 (A)

Also published as:

Publication date: 2000-11-21

JP3746181 (B2)

Inventor(s): HATANAKA YASUMARU +

Applicant(s): SEIKAGAKU KOGYO CO LTD +

Classification:

- international: C07D229/02; C07D403/12; C07D495/04; C07H1/00; C07H5/04; G01N33/53; G01N33/532; G01N33/566; C07D229/00; C07D403/00; C07D495/00; C07H1/00; C07H5/00; G01N33/53; G01N33/532; G01N33/566; (IPC1-7): C07D229/02; C07D403/12; C07D495/04; C07H1/00; C07H5/04; G01N33/53; G01N33/532; G01N33/566

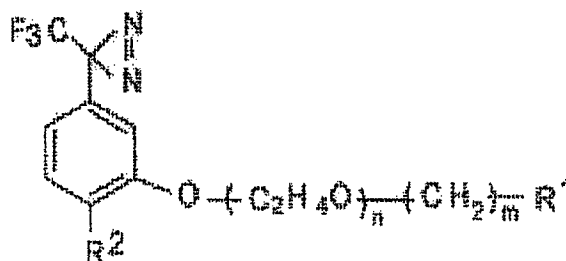
- European:

Application number: JP20000059547 20000303

Priority number(s): JP20000059547 20000303; JP19990057255 19990304

Abstract of JP 2000319262 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a novel compound useful as a synthetic intermediate for a stable and useful biotinylated phenyldiazirine compound for simply producing photoaffinity reagents. SOLUTION: A compound expressed by the formula R1 is NHP1 (P1 is an amino-protective group), COX1 [X1 is an alkoxy, OH, NHSO2-X2-CO-X3 (X2 is an arylene or alkylene; X3 is an alkoxy or OH)]; R2 is an aldehyde, a lower hydroxy alkyl, a halogenated lower alkyl, (CH2)x-O-NHP1 (x is 1-4) or the like; m is 1-4; n is 1-6, e.g. 2-[2-[2-(2-tert-butoxycarbonylaminoethoxy) ethoxyethoxy]-4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzyloxyphthalimide). The compound of the formula is produced, e.g. by using [2-methoxy-4-(1-aziridin-2,2,2-trifluoroethyl) benzaldehyde] as a starting raw material.



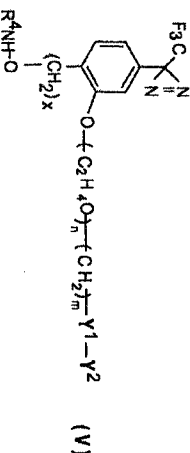
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

3
 (式中、R¹は、7アルキオミド基、アミノ基、-NH²、又はアミノ基の塩を表し、P¹はアミノ保護基を表し、mは1~4の整数を表し、nは1~6の整数を表し、Xはアール-1ン基又はアルキル基を表し、Zはペロリン系で中断されているもよい炭素数1~2のアルキル基を表し、

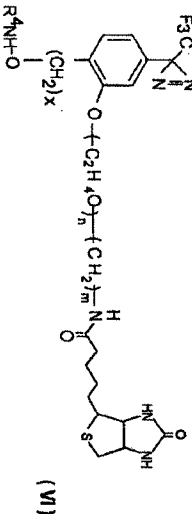
4
 *ノ基を表し、xは1~4の整数を表し、qは0又は1を表す。)

【請求項5】 下記一般式 (I) で表される鎖状結合ポリチン化7-エニルジアリジニ化合物。

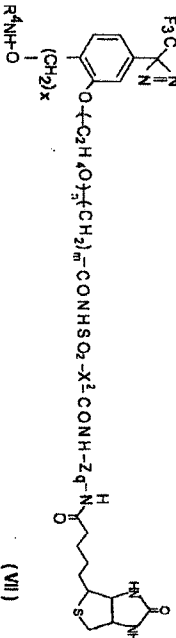
【化5】



※ 4 の整数を表す。）
 【諸第6項】 下記一般式 (VI) で表される縮合ポオチンにエニルシクリ化化合物。
 【化】



【試料調製】 下記一般式 (VII) で表される数値合計
★
式中、R'は、環状末端をもつ化合物の残基を表
し、mは1~4の整数を表し、nは1~6の整数を表
し、xは1~4の整数を表す。)
★
【化7】
30 オチン化7エニルジブジニ化合物。



(式中、Rは、還元末端基をもつ糖化化合物の残基を表し、Xは、アリール基又はアリール基を表し、2は、ベンゾ原子で置換されているように酸素原子を2つのアリール基に基を表し、mは1~4の整数を表し、nは1~6の整数を表し、xは1~4の整数を表し、qは0又は1を表す。)

【請求項8】 請求項2記載の一般式(II)で表されるオチン化アニリンジリッ化化合物を含む光反応性顔料試薬。但し、一般式(II)中、R'はアミノ基、又はア

るオチン化アニリンジリッ化化合物を含む光反応性顔料試薬。但し、一般式(II)中、R'はアミノ基、又はア

【請求項10】 請求項4記載の一般式(IV)で表されるオチン化アニリンジリッ化化合物を含む光反応性顔料試薬。但し、一般式(IV)中、R'はアミノ基、又はア

【請求項11】 請求項5記載の一般式(V)で表されるオチン化アニリンジリッ化化合物を含む光反応性顔料試薬。但し、一般式(V)中、R'はアミノ基、又はア

【請求項9】請求項3記載の一般式(II)で表され 50
【請求項12】請求項6記載の一般式(VI)で表され

50 【請求項12】請求項6記載の一般式(VI)で表され

特開2000-319262

5
る糖結合とオチン化フェニルジアリル化合物を含む光
親和性阻害試薬。
【請求項13】 請求項7記載の一般式 (Ⅱ) で表
される糖結合とオチン化フェニルジアリル化合物を含む
光親和性阻害試薬。

【請求項4】 上記一般式(II)で表われるオクチン化エチルシラン化合物と還元末端を有する糖化末端物を反応させ、該還元末端を有する糖化末端のアルキル基と下式とをオクチン化エチルシラン化合物のメニソ基とのシラン塩基を形成させることを含む上記一般式(VI)で表わされる糖化物質とオクチン化エチルシラン化合物の製造方法。但し、一般式(II)中、R₁は、アミノ基、又はアミノ基の塩を表す。

【請求項15】 ビオチン化フェニルジアジロン化合物が上記一般式(III)で表され、糖類がビオチン化フェニルジアジロン化合物が上記一般式(VI)で表される請求項14記載の製造方法。

【請求項16】 ビオチン化フェニルジアジリル化合物が上記一般式(IV)で表され、糖結合体ビオチン化フェニルジアジリル化合物が上記一般式(VII)で表される請求項14記載の製造方法。

【請求項17】 上記一般式 (V) で表される錯化剤とオクチルエニルジシジシシシ化合物と錯化反応を遂行して錯化エニルジシシシシシ化合物と錯化反応と錯化剤との特異的相互作用による錯化されるとともに、該錯化剤に光を照射し、該錯化剤、一般式 (V) の化合物に結合している錯化剤と相互作用する部位と、一般式 (V) の化合物を光反応により結合させ、該錯化反応を認識することからなる錯化剤の認識方法。

【請求項18】 錯化剤とオクチルエニルジシシシシシ化合物が上記一般式 (VI) で表されることからなる請求項17記載の錯化剤の認識方法。

【請求項19】 糖結合とオチン化フェニルジアジリル化合物が上記一般式(VIII)で表されることからなる請求項17記載の糖受容体の標識方法。

【発明の詳細な説明】

【00001】
【発明の属する技術分野】 本発明は、新規な光反応性フエニルジアジリオン化合物、光反応性ビオチン化フエニルジアジリオン化合物、及び光反応性糖結合ビオチン化フエニルジアジリオン化合物、

ニルジジアリソニ化合物に係わるものであり、更に、本発明は生体物質構造解析のフローへの用途が期待される。該光反応性とオチン化フエニルジジアリソ化合物からなる光反応性標識試薬、及び光反応性糖結合とオチン化フエニルジジアリソ化合物からなる光親和性標識試薬に係わるものである。

【00002】
【従来技術】 光朝和性標識試薬は、薬物あるいはリガンドと蛋白質との相対的結合部位を解析できる有用なプローブとして知られている。蛋白質を光反応により標識する

(4) 特開2000-319262

6

光反応基としてはアジド基が古くから知られていたが、より優れた光反応基としてアジドシリルが注目されている。薬物や生体物質由来のリガンドへのアジドシリル基の導入は、一般にアミド結合やエステル結合により行われ、さらに微量量出のために放射性の誘導体に変換されている。

【0003】ごく最近になり、蛋白質の微量検出とアミノ酸イオン精製を同時に実現するものとして、分子内にスベアサー化合物を介してオチン残基を有するフエニルジプロシ誘導体が開発され、例えば、生体物質由来のγガンゴにこの糖化化合物を該ジプロシ誘導体のカルボキシル基に結合させることにより非放散性の放射性標識試薬の合成が可能であることが報告されている。

る(有機合成化学協会誌、第56巻第7号、第581~590頁(1998); フアルベンジ、Vol. 34, No. 8, 第772~776頁(1999); Bloch et al. (1998) 330, 1209~1215)。しかし、この方法では、該ジブタリオン誘導体に糖化合物を結合させる場合、該糖化合物に予めアミノ基を導入し、この誘導体が有するカルボキシ基と、ジブタロヘキシリルカルボジイミド(DCC)等の縮合剤の存在下で反応

【發明の解決しようとする課題】本発明は、放射性標識された生体物質を特異的に修飾する方法として、オキソシアミノ基の利用が注目されているが、該オキソシアミノ基を反応性化合物に導入し、糖化合物と結合せよとする試みは未だ成されていない。

を施す必要がない)光反応性アロブへ導くことが可能となる。新規な光反応性オプチカルエニルジアリリル化合物を、含む光反応性繊維、試薬、及び、糖と相互作用する蛋白質(糖受容体)などの生体高分子の機能や構造を研究するうえで有用性が期待される非放射性的光反応性糖結晶化オプチカルエニルジアリリル化合物を含む光反応性繊維、繊維試薬を提供することを目的とする。本発明の更なる

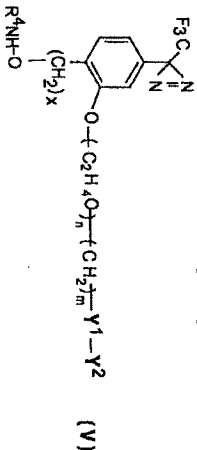
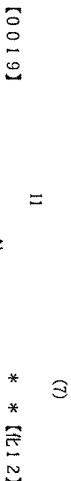
目的は、これらの有機試薬を構成するために有用な新規架橋化合物としてオクチル化フェニルジメチルシロキサン化合物、及び脂肪族結合したオクチル化フェニルジメチルシロキサン化合物、希望により二つの異なる官能基のスペーサーを介してフェニルジメチルシロキサン化合物と連結している該化合物、加えてこれらの化合物を取得するための合成中間体である新規なフェニルジメチルシロキサン化合物を提供すること、並びにこの新規有機結合化合物

【課題を解決するための手段】 本発明の要旨は、前記……
 式(1) (1)〜(IV)の少なくとも一つで表されるビオチン化
 化フェニルジグリジン化合物、及びその合成中間体であ
 る前記 式(1) で表されるフェニルジグリジン化合物
 とビオチン化フェニルジグリジン化合物の製法及び該化合
 物による感受体の標識方法を提供することにある。

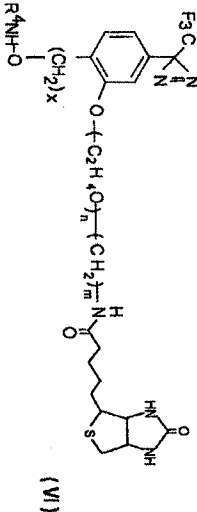
[000051]

物、さらに、該一般式 (I) ~ (IV) の少なくとも一つから誘導され、各式に対応して前記一般式 (V) ~ (VII) の

50 ら誘導され、各式に対応して前記一般式 (V) ~ (VII) の



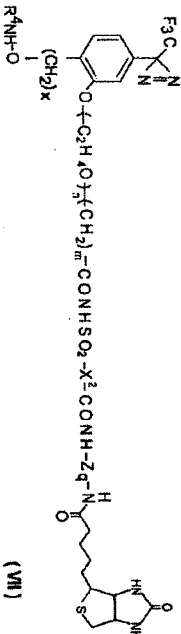
【0020】一般式(V)中、R'は、還元末端をもつ糖化化合物の残基を表し、mは1～4、好ましくは1～2の整数を表し、nは1～6、好ましくは1～4の整数を表し、xは1～4、好ましくは1～2の整数を表す。Y'は-NH-又は-CONHSO₂-X'-CO-を表し、X'はアリール基又はアルキル基を表し、Y'はビオチン



一般式(VI)中、R'、m、n、xは上記一般式(V)におけるものと同義を表す。

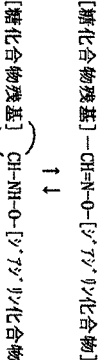
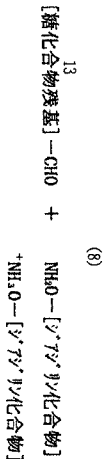
★【0022】

★【化14】



一般式(VII)中、R'、m、n、x及びY'は、上記一般式(V)におけるものと同義を表し、Z及びqは、上記一般式(VI)におけるものと同義を表す。一般式(VII)で示される化合物は、切断性スベアーを有する糖結合とオチン化フエニルジアリル化合物であり、特にXがフエニル基、q=0の化合物は、ラベル蛋白質の分離・回収に有用な光親和性標識試薬を構成する化合物として好ましい。

【0023】一般式(II)～(IV)で示される化合物と対応させる糖化合物としては、還元末端を持つ多糖類、オリゴ糖類、単糖類、例えば、ムチン型糖類、Asn型糖類、シヤリル糖類、グルコサミンシヤリカン、ラクトサミン、N-アセチルラクトサミン、ラクトサミンオリゴ糖、シヤリルラクトサミン、ガラクトン、マンナン、フルクタ



【0025】本発明の一般式(II)～(IV)で示される化合物において、R'がアミノ基又はアミノ基の塩である化合物と、還元末端を有する糖化合物との反応はpH依存性であり、該反応は弱酸性下有利に進行する。逆反応はpH4～5に調整されて行われる。本発明の一般式(II)～(IV)で示される光反応性オチン化フエニルジアリル化合物の一種は、そのフエニル骨格にスベアーを介してオキシアミノ基が導入されている特徴を有し、このオキシアミノ基は、還元末端を有する糖化合物の還元末端のアルデヒド基と、糖鎖水酸化の保護基とを特に必要とせず、また従来必要とされているDCC等の縮合剤も存在せしめることなく、単に糖化合物と混合するだけでジツツ塩基形成反応により結合し、一般式(V)～(VII)で示される糖結合とオチン化フエニルジアリル化合物を生成する。そして、この化合物によって本発明の光親和性標識試薬を構成することができる。該試薬は、この化合物の機能を「さない限り、水、緩衝液、安定化剤、塩等の添加物を含まなくてもよい。また、一般式(II)～(IV)の化合物のオキシアミノ基は、アルデヒド基以外にケトン基、カルボキシル基とも結合し得るので、糖化合物がこれらの反応基を有する場合はその官能基とオキシアミノ基を反応させてもよい。なお、光親和性標識試薬とは、広義には、光反応性基を有する化合物にリガンドを結合した標識試薬を指称するが、本明細書において「光親和性標識試薬」とは、光反応性糖受容体親和性標識試薬を意味するものとし、糖受容体とは糖と親和性を有する、すなわち糖との特異的な相互作用により糖に結合性を示す蛋白質を意味し、具体的に糖に特異的なラクトン、レセプター、酵素、抗体などを包含する。

【0026】本発明の光親和性標識試薬と種々の蛋白質を含む相互作用において、該標識試薬の糖化合物と糖受容体の相互作用をおこなわせると同時に又はその後、光を照射すると、光親和性標識試薬の糖化合物に特異的に相互作用する蛋白質(糖受容体)の、該糖化合物との相互作用部位(アミノ酸)に該標識試薬のジアラリル基が光反応によりクローズングする。更に、このオチンを含む該光親和性標識試薬でラベル化された蛋白質(ラベル蛋白質)は、ビオチンを検出する自己公知の検出系

によって高感度での検出が可能であり、アビジン、ストレプトアビジン等を担体に結合したアビジンガラムを利用することにより、アラニニクローマトグラフィーによって目的蛋白質を容易に精製することが可能になる。更に、本発明においては、光親和性標識試薬を構成する糖化合物としてビオチンが切断性スベアーを介して結合された化合物を適用することにより、アビジンガラムによるアラニニクローマトグラフィーを行う際、緩衝液条件でビオチン部分を容易に切り離すことができ、目的蛋白質を高い回収率で取得することが可能である。それ故、糖化合物を結合した本発明の光親和性標識試薬は、糖鎖関連蛋白質の構造及び機能解析に極めて有用なツール又は精製手段となることが期待されるのである。

【0027】本発明の一般式(II)で示され、オキシアミノ基がフエニル骨格に有する光反応性オチン化フエニルジアリル化合物に、そのオキシアミノ基と選択的に反応する、例えばアルデヒド基、ケトン基、カルボキシル基などを有するか、或いは必要に応じてこれらの基が導入された薬物或いは糖化合物以外の生体由来成分をリガンドとして結合させることにより、広義の意味での光親和性標識試薬は誘導することもできる。そして、この試薬は、薬物あるいは糖化合物以外の生体由来物質に親和性を持つ蛋白質の構造及び機能解析のツールとなり又同様に薬物も可能とする。この点にして、多種多様なリガンドを選択する手法で得ることができアローナリアラリト、質量分析装置による超微量解析を組み合わせた応用は、蛋白質機能の高速度・高感度解析への展望を開くものとして期待される。従って、一般式(II)で示される本発明の化合物は極めて広範な有用性を有する化合物である。

【0028】本発明の化合物の合成の一例を図1～6に示す反応スキームに基づいて以下に説明する。まず、図1に示す反応(1)に従い、一般式(1)で示される本発明の化合物、即ち、図中化合物(4)～(7)の製造工程を説明する。出発原料である化合物(1)、[2-α-(1-γ'-2,2,2-トリフルオロ)ベンゾイル]は、橋本らの方法(山崎asthmo, Y. Kaneko, Y. Hanaka, Heterocycles, 46, 119-122(1997))により調製することができる。化合物(1)

は、例えばジフロロメタンなどの溶媒中、不活性ガス雰囲気下、-2.0℃付近で8時間を作成した後に、(1)化合物(2)を生成させる。生成した化合物(2)に、化合物(3)を酸素水浸漬(10リットルなどの塩基及び CuI などの相転移助触媒の存在下反応させることにより、化合物(4)を生成することができる。この反応は、 $\text{P}^{\text{t}}\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (DMPE)中、不活性ガス雰囲気下、6.0℃付近で行うことができる。なお、化合物(3)は、式 $\text{P}^{\text{t}}\text{N}(\text{HC}(\text{H})_3)$ (COC, H), -Brに H において、 H を CH_3 、 P^{t} が $\text{t}\text{-Bu}$ 、 C が $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ である化合物であり、畑中らの方法 (Y. Hatanaka, M. Hatanaka, Y. Kaneko, *Bioorg. Med. Chem.* 2, 1367-1373 (1994))により調製することができる。

(計算値), 464.1397(実測値)

【0042】実施例4 (化合物(5) → (6))
上記の方法で化合物(4) 3.69g (8mmol) から得られた粗化合物(5)と四炭化炭素3.32g (0.01mol)とを16mlのジクロロメタンに溶解し、0℃に冷却しながらトリエニルホスフィン3.15g (0.012mol)をゆっくり加えた。10分後、無水炭酸カリウム1.66g (0.012mol)を加え、ジクロロメタンに氷を加え、ジクロロメタンで抽出し、ジクロロメタン層を無水炭酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶媒剤：酢酸エチル：ヘキサン=1:1)で精製して3.62gの淡黄色油状物質として化合物(6) (2-12-[2-(2-tert-ブチルホキシ)エチル]エチル)-4-(3-(4-メチル)-3-ブチル-2-ブチル)エチル)を得た(収率：8.6%)。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃, 25℃): δ=7.35(d, J=8.1Hz, 1H), 6.77(d, J=8.1Hz, 1H), 6.65(br s, 1H), 5.00(br, 1H), 4.55(s, 2H), 4.21(c, J=4.8Hz, 2H), 3.91(c, J=4.8Hz, 2H), 3.75(s, 2H), 3.65(s, 2H), 3.55(t, J=5.1Hz, 2H), 3.3(s, 2H), 1.43(s, 9H)。

MS (FAB⁺): m/z (%): 550 (41) [M+N a]⁺, 548(40), 528(12) [M+H]⁺, 526(11); HRMS: (C₂₈H₄₀)_n, F₂N₂O₆ [M+H]⁺ = 526.1164(計算値), 526.1193(実測値)

【0043】実施例5 (化合物(6) → (7))

化合物(6) 2.63g (5mmol)、N-エピロキシブタリミド9.79mg (6mmol)、無水炭酸カリウム6.91mg (5mmol)、及びMgSO₄ 1.0mlの混合物を室温で12時間かくはんした。その後、反応混合物の溶媒をオイルボンプを用いて減圧留去し、得られた残渣に水を加え、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を水、1N NaOH及び飽和食塩水で順次洗浄して無水炭酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶媒剤：ヘキサン：アセトン=3:1)で精製して2.59gの淡黄色油状物質として化合物(7) (2-12-[2-(2-tert-ブチルホキシ)エチル]エチル)-4-(3-(4-メチル)-3-ブチル-2-ブチル)エチル)を得た(収率：8.5%)。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃, 25℃): δ=7.82-7.73(AB, 4H), 7.54(d, J=7.9Hz, 1H), 6.81(d, J=7.9Hz, 1H), 6.66(br s, 1H), 5.27(s, 2H), 5.05(br, 1H), 4.15(t, J=4.8Hz, 2H), 3.86(t, J=4.8Hz, 2H), 3.7(s, 2H), 3.6(s, 2H), 3.54(t, J=5.2Hz, 2H), 3.3(s, 2H), 1.42(s, 9H)。

MS (FAB⁺): m/z (%): 631 (100) [M+N a]⁺, 609(9) [M+H]⁺, HRMS: C₂₈H₄₀F₂N₂O₆ [M+H]⁺ = 609.2172(計算値), 609.2164(実測値)

【0044】実施例6 (化合物(7) → (8))

化合物(7) 3.04mg (5mmol)をジクロロ

メタソル0.5mlに溶解し、0℃に冷却しながらトリアルオロ所後0.5mlをゆっくり加え、反応混合物を0℃で1時間かくはんした。溶媒を減圧留去して得られた残渣にトルエン1mlを加え、減圧留去した。この操作を計3回繰り返して、残存する過剰のトリアルオロ酢酸を除いて得られる黄色油状残渣をDMF 0.5mlに溶解し、ヒオチン-N-ヒドロキシスクラミン2フェニル1.71mg (0.5mmol)を2mlのDMFに溶解した溶液を加え、抽出したトリエニルホキシの存在下反応混合物を室温で14時間かくはんした。その後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をジクロロメタンとメタソール1:1の混合溶媒に溶解し、1N NaOH、飽和食塩水、0.1N HCl、及び飽和食塩水で順次洗浄して無水炭酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶媒剤：クロロホルム：エタノール=10:1)で精製して32.0mgの無色固体として化合物(8) (2-12-[2-(2-tert-ブチルホキシ)エチル]エチル)-4-[3-(4-メチル)-3-ブチル-2-ブチル]エチル)を得た(収率：8.7%)。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃, 25℃): δ=7.83-7.73(AB, 4H), 7.53(d, J=7.9Hz, 1H), 6.84(s, 1H), 6.81(d, J=7.9Hz, 1H), 6.64(s, 1H), 6.61(s, 1H), 5.64(s, 1H), 5.26(s, 2H), 4.5(s, 1H), 4.3(s, 1H), 4.15(c, J=4.8Hz, 2H), 3.90(c, J=4.8Hz, 2H), 3.7(s, 2H), 3.65(s, 2H), 3.55(s, 2H), 3.4(br s, 2H), 3.1(s, 1H), 2.9(s, 1H), 2.72(d, J=12.5Hz, 1H), 2.19(c, J=7.5Hz, 2H), 1.8-1.6(m, 4H), 1.4(s, 2H)。

MS (FAB⁺): m/z (%): 757(16), [M+H]⁺, 735(62) [M+H]⁺; HRMS: C₂₈H₄₀F₂N₂O₆ S [M+H]⁺ = 735.2424(計算値), 735.2458(実測値)

【0045】実施例7 (化合物(8) → (9))
化合物(8) 7.3mg (0.01mmol)を無水トルエンの1mlメタソール溶液1mlに溶解し、室温で30分間反応させた。その後、溶媒を減圧留去して得られた残渣にトルエン1mlを加え、減圧留去した。この操作を計3回繰り返して、残存する過剰のトルエンを除いて無色固体として化合物(9)を得た。化合物(9)は精製することなく直ちに次の反応に用いた。

【0046】実施例8 (化合物(9) → (10))

上記の方法で化合物(9) 7.3mg (0.01mmol)から得られた粗化合物(8)をクロロホルムとアセトン1:1の混合溶媒1mlに溶解し、1(C₂H₅)₂CO:CO₂:0.10.9mg (0.5mmol)とトリエニルホキシ5.1mg (0.5mmol)を加えて室温で14時間反応させた。その後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶媒剤：クロロホルム：エタノール=10:1)で精製して6.4mgの無色固体として化合物(10) (2-12-[2-(2-tert-ブチルホキシ)エチル]-4-[3-(4-メチル)-3-ブチル-2-ブチル]エチル)を得た(収率：9.5%)。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃, 25℃): δ=8.3(s, 1H), 7.39(d,

J=7.9Hz, 1H), 6.97(br, 1H), 6.81(d, J=7.9Hz, 1H), 6.64(s, 1H), 6.58(s, 1H), 5.66(s, 1H), 4.91(s, 2H), 4.5(s, 1H), 4.3(s, 1H), 4.16(c, J=4.5Hz, 2H), 3.87(c, J=4.5Hz, 2H), 3.7(s, 2H), 3.65(s, 2H), 3.55(s, 2H), 3.4(br s, 2H), 3.1(s, 1H), 2.9(s, 1H), 2.70(d, J=12.8Hz, 1H), 2.17(c, J=7.3Hz, 2H), 1.8-1.6(m, 4H), 1.45(s, 9H), 1.4(s, 2H); UV/VIS (MeOH): λ_{max} (ε) = 360(400), 283(2800)。

MS (FAB⁺): m/z (%): 727(100), [M+N a]⁺, 705(12) [M+H]⁺; HRMS: C₂₈H₄₀F₂N₂O₆ S [M+H]⁺ = 705.2853(計算値), 705.2853(実測値)

【0047】実施例9 (化合物(10) → (11))
化合物(10) 7mg (0.01mmol)をジクロロメタソル0.1mlに溶解し、0℃に冷却しながらトリアルオロ所後0.1mlをゆっくり加え、0℃で1時間反応させた。その後、溶媒を減圧留去して得られた残渣にトルエン0.1mlを加え、減圧留去した。この操作を計3回繰り返して、残存する過剰のトリアルオロ酢酸を除き、淡黄色固体として化合物(11)を得た。化合物(11)は精製することなく直ちに糖化合物類との縮合反応に用いた。

【0048】実施例10 (化合物(11) → (12))

上記の方法で化合物(11) 7mg (0.01mmol)から調製した粗化合物(11)をアセトン1.9mlに溶解し、N-アセチルカラトサミン1.9mg (0.005mmol)の氷溶液を加え、37℃で4.0時間反応させた。反応混合物をシリカゲルカラム(セフエン科学AQUSiLS-1251-120, 4.6f x 250mm)を用いてHPLCにより精製した。収量は、メタソール溶液のUVスベクトルを測定し、化合物(11)のUVスベクトル(361nm (ε=3.86))を基準として求め、0.031mmolの化合物(11)を得た。(収率6.3%)。

HPLC条件: 90%aq. C₂H₅CN→75%aq. C₂H₅CN, 2.0min, 1ml/minMS (FAB⁺): m/z (%): 968(64)

[M-H]⁻; HRMS: C₂₈H₄₀F₂N₂O₆ S [M-H]⁻: 968.3535(計算値), 968.3565(実測値)

【0049】実施例11 (化合物(11) → (13))
実施例9の方法で化合物(11) 3.5mg (0.005mmol)から調製した化合物(11)とシアリル-α2-3-ガラクト-ス1.6mg (0.0025mmol)を、実施例10と同様の条件で反応させた。同様にHPLC精製後、0.012mmolの化合物(11)を得た。(収率4.8%)。

HPLC条件: 95%aq. C₂H₅CN→50%aq. C₂H₅CN, 1.0min, 1ml/minNegative ion PAB-Ms (3-nitrobenzylalcohol) m/z: 1218 [M-H]⁻ HR-FAB-Ms (3-nitrobenzylalcohol) m/z: 1218 [M-H]⁻ HR-FAB-Ms (3-nitrobenzylalcohol)

C₂₈H₄₀F₂N₂O₆ S [M-H]⁻: 1218.4223(計算

値), 1218.4257(実測値)
【0050】実施例12 (化合物(11) → (14))
実施例9の方法で化合物(11) 4.3mg (0.006mmol)から調製した化合物(11)とシアリル-α2-3-N-アセチルカラトサミン(純度9.5%) 1.0mg (0.0014mmol)を、実施例10と同様の条件で反応させた。同様にHPLC精製後、0.0085mmolの化合物(14)を得た。(収率6.1%)。

HPLC条件: 85%aq. C₂H₅CN→70%aq. C₂H₅CN, 15min, 1ml/min

Negative ion PAB-Ms (3-nitrobenzylalcohol) m/z: 1259 [M-H]⁻ HR-FAB-Ms (3-nitrobenzylalcohol)

C₂₈H₄₀F₂N₂O₆ S [M-H]⁻: 1259.4489(計算値), 1259.4507(実測値)

【0051】実施例13 (化合物(11) → (15))
実施例9の方法で化合物(11) 1.4mg (0.002mmol)から調製した化合物(11)とルイスX型三醇0.5mg (0.00094mmol)を、実施例10と同様の条件で反応させた。同様にHPLC精製後、0.00073mmolの化合物(15)を得た。(収率7.8%)。

HPLC条件: 90%aq. C₂H₅CN→70%aq. C₂H₅CN, 15min, 1ml/min

MS (FAB⁺): m/z (%): 1114(47) [M-H]⁺; HRMS: C₂₈H₄₀F₂N₂O₆ S [M-H]⁺: 1114.4114(計算値), 1114.4163(実測値)

【0052】実施例14 (化合物(11) → (16))
実施例9の方法で化合物(11) 1.7mg (0.0024mmol)から調製した化合物(11)とシアリルルイスX型四糖(純度9.5%) 1mg (0.0012mmol)を、実施例10と同様の条件で反応させた。同様にHPLC精製後、0.00085mmolの化合物(16)を得た。(収率7.1%)。

HPLC条件: 85%aq. C₂H₅CN→65%aq. C₂H₅CN, 15min, 1ml/min

MS (FAB⁺): m/z (%): 1405(29) [M-H]⁺; HRMS: C₂₈H₄₀F₂N₂O₆ S [M-H]⁺: 1405.5068(計算値), 1405.5143(実測値)

【0053】参考例1 (シクロチンの光親和性糖鎖実験)
化合物(12) ~ 化合物(16)による光親和性糖鎖実験は例14 (Y. Hatanaka, M. Hashimoto, R. Nishihara, H. Maruhashi, Y. Kaneko, Carbohydr. Res., 294, 95-108 (1996))の方法に準じて以下の通り行った。0.1Mリブシ酸緩衝液, pH 7.6中、化合物(12) ~ 化合物(16)のいずれかの光親和性糖鎖試薬(0.1mM)及びリブチン(サテニツト緩衝液0.1mM)を含む光親和性糖鎖試料を各0.05ml調製した。別に对照

溶媒に溶かし、0℃で30分間攪拌した。0℃に冷却し
ながら5N HCl 0.15mlを加えてpH3付近に
調節した後、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽
和食塩水で洗浄して無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶
媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶離剤：ク
ロホルム：メタノール=5：1)で精製して99mg
の淡黄色油状物質として化合物(26)を得た(収率：
89%)。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃, 25℃): δ=1.43 (br, s, -C
H₂-), 3.68-4.10 (2H, m, O-CH₂-), 4.23 (CH, s, O-CH₂-O-
), 4.91 (2H, s, Ph-CH₂-), 6.65 (H, s, Ph-H), 6.77 (H, d, J=
8.1Hz, Ph-H), 7.35 (H, d, J=8.1Hz, Ph-H), 8.17-8.23 (4H,
m, Ph-H), 8.03 (H, bs, -NH)

【0064】実施例23 (化合物(26) + (27)
→ (28))

化合物(26) 72mg (0.1mmol) をジクロロ
ロメタン1mlに溶解し、N-ヒドロキシスチレンイ
ミド 1.3mg (0.1mmol) とDCC 2.3mg
(0.11mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。
溶媒を減圧留去し、残渣をDMSO 1mlに溶解し、
ピオチンピロラジド (27) 26mg (0.1mmol)
を加えて室温で一晩攪拌した。反応液を直接シリカ
ゲルカラム(溶離剤：クロロホルム：メタノール=5：
1)で精製して10mgの淡黄色固体として化合物(2
8)を得た(収率：10%)

Positive ion FAB/MS (3-nitrobenzylalcohol) m/
z: 961 (M+H)⁺

【0065】実施例24 (化合物(11) → (2
9))

実施例9の方法で化合物(10) 3.5mg (5μmol)
1) から調製した化合物(11)とキトピオース 1.
1mg (2.5μmol) を実施例10と同様な条件で
反応させた。同様にHPLC精製後、1.2μmolの
化合物(29)を得た(収率：48%)。

HPLC条件: 85% aq. CH₃CN, 1ml/min
Positive ion FAB/MS (3-nitrobenzylalcohol) m/z:
1011 (M+H)⁺, 1033 (M+N a)⁺

【0066】実施例25 (化合物(28) → (3
0))

実施例9の方法で化合物(28) 9.6mg (10μmol)
01) を脱保護し、キトピオース 2.1mg (5μmol)
01) を実施例10と同様な条件で反応させた。同様に
HPLC精製後、1.0μmolの化合物(30)を得
た(収率：2%)。

HPLC条件: 90% aq. CH₃CN→80% aq. CH₃
CN 20min, 1ml/min Positive ion FAB/MS (3-nitroben
zylalcohol) m/z: 1266 (M+H)⁺, 1286 (M+N a)⁺

【0067】参考例2 (WG Aの光親和性標識実験)
化合物(29)、化合物(30)の光親和性標識実験を参考
例1と同様な方法で行った。0.1Mリン酸緩衝液、pH 5.0

H7.6中に、化合物(29)及び化合物(30)のいずれ
かの光親和性標識試薬(0.1mM)及びWG A (小麦
胚芽リブチン(wheat germ agglutinin)/サフエニット濃
度0.1mM)、を含む光親和性標識試薬を各0.05m
l調製した。別に対照試薬として、化合物(29)及び化
合物(30)のいずれかの光親和性標識試薬(0.1m
M)、WG A (サフエニット濃度0.1mM)、及びキ
トピオース0.1Mを含む0.1Mリン酸緩衝液、pH
7.6を各0.05ml調製した。以上のようにして調
製した、光親和性標識試薬試料及び対照試料を遮光下、
25℃で30分間インキュベートした後、30W 長波
長UVランプ(フナコジ、XX-15)を用いて、上方5c
mの距離から、氷上0℃で1時間照射した。照射後の各
試料は、常法に従い、SDS-ポリアクリルアミド電気
泳動で分離後、PVDHに転写して化学発光検出により光
標識バンドを検出した。対照実験により、分子量2K
のWG Aバンドの光標識が阻害されることから、標識は
WG Aに特異的であることを確認した。

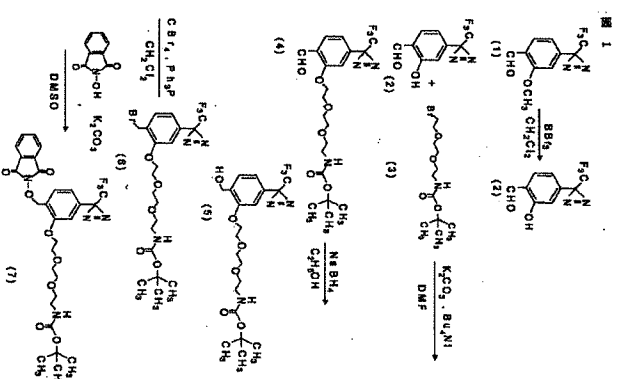
【0068】スベーターの切断は、照射後の各試料 1
0μlをとり、7Mグアニジン、EDTA 2Na, 10
mMを含む0.5Mトリス塩酸緩衝液、pH8.5、10
μlに溶かし、0.7M DTT 10μlを加えて室温
2時間反応させた。さらに、1Mヨード酢酸ナトリウ
ム 10μlを加えて室温4時間、さらに4Mメルカプ
トエタノールを加えて5時間反応させた後、0.1Mリ
ン酸緩衝液、pH7.6に対して透析した後、同様に電
気泳動により解析した。切断反応後は、化合物(30)に
よるWG Aバンドの分子重量2.2Kが消失すること
により、切断を確認した。

【0069】
【発明の効果】 本発明の一般式(I)で示される化合物、
特にオキザミン基およびその塩を有する上記化合物(1
1)は、還元末端を有する糖化合物は、特別の保護処理を
施すことなく、一段階で反応して光反応基(ジアジ
ン)とピオチンを有する一般式(V)の糖結合アフェルジ
アジジン化合物を導くことができ、この一般式(V)の化
合物は、光親和性標識試薬として、糖と相互作用する蛋
白質(糖受容体)のピオチン標識に極めて有用である。
しかも、該一般式(V)の化合物において、ピオチンが切
断性スベーターを介してアフェルジジン骨格に結合
している化合物は、固定化アフェルジンからのラベル化した
蛋白質の連続・回収が容易である点で優れている。従っ
て、一般式(II)の化合物は、光親和性標識試薬を簡単に
製造するための安定した有用な化合物であり、この一般
式(II)の化合物の合成中間体である、一般式(I)の化合
物も有用性の高い物質である。

【図面の簡単な説明】
【図1】 本発明の一般式(I)化合物を合成する一例を
示す反応スキームの概略図である。
【図2】 本発明の一般式(II)化合物を合成する一例を
示す反応スキームの概略図である。

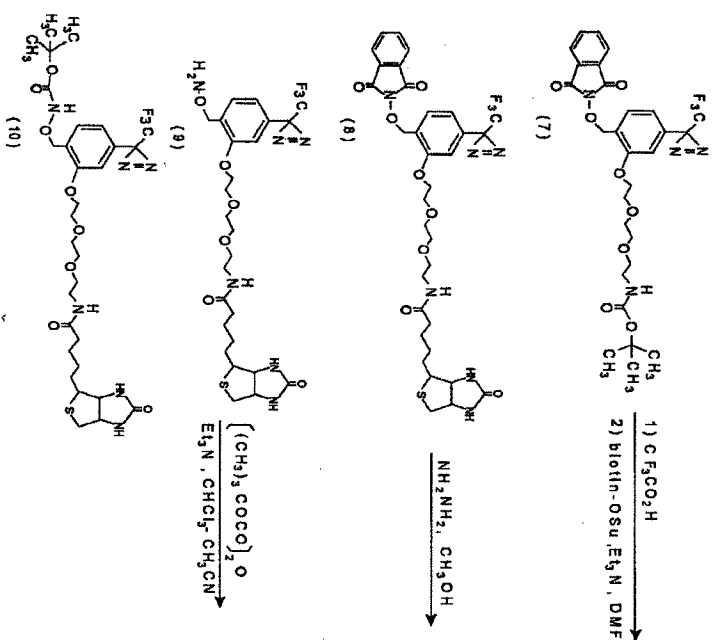
示す反応スキームの概略図である。
【図3】 本発明の一般式(V)化合物を合成する一例を
示す反応スキームの概略図である。
【図4】 本発明の一般式(V)化合物を合成する一例を
示す反応スキームの概略図である。

【図1】



【図2】

図 2



【図3】

図 3

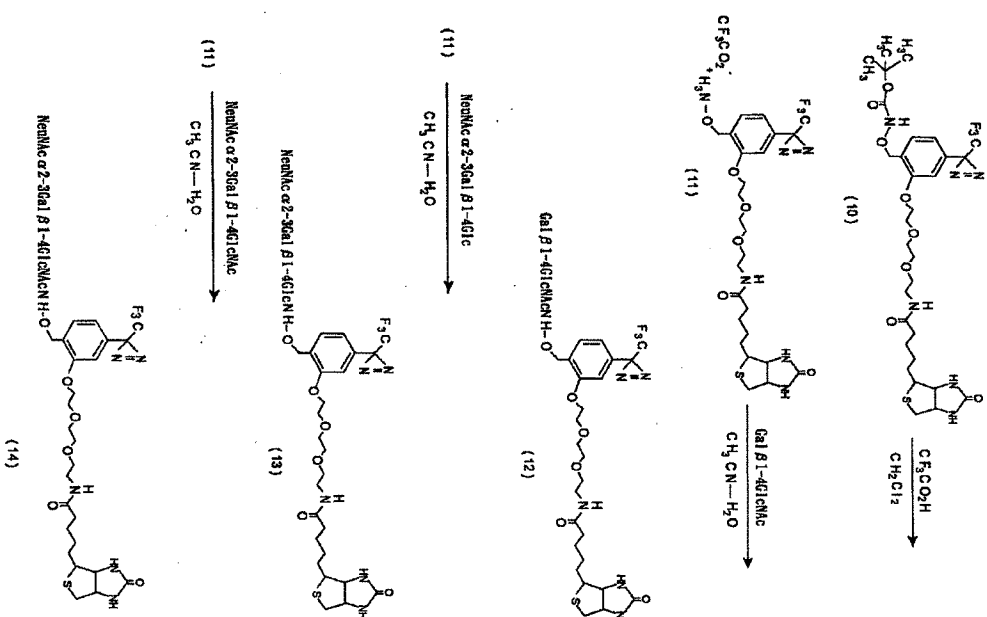


図 4

【図4】

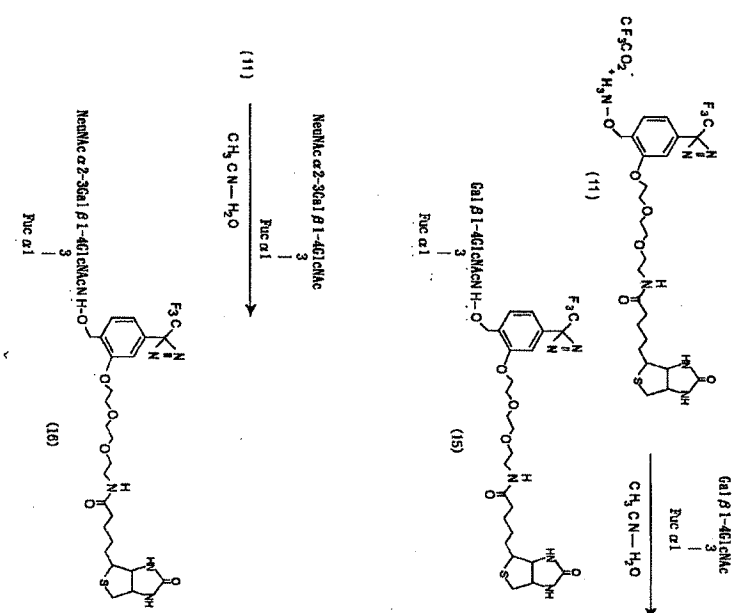
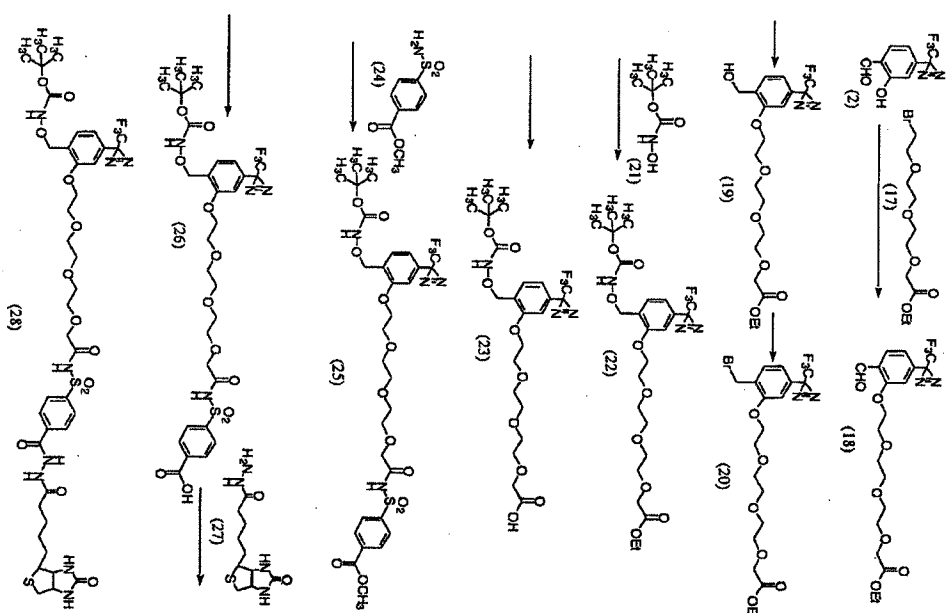


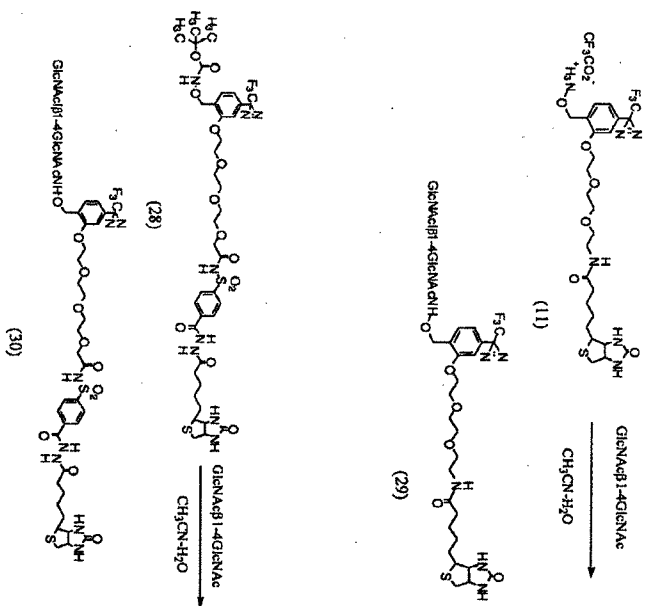
図 5

【図5】



【図6】

図 6



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	7-73-1* (参考)
G 0 1 N 33/532		G 0 1 N 33/532	
// G 0 1 N 33/53		33/53	A
33/566		33/566	U